

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

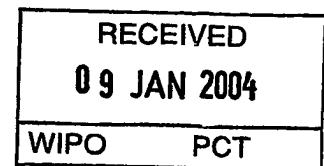
12.11.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 2 年 1 1 月 1 4 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 2 - 3 3 0 6 7 7
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 2 - 3 3 0 6 7 7]



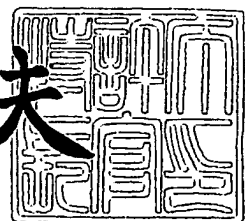
出 願 人
Applicant(s): 財団法人化学及血清療法研究所

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 3 年 1 2 月 1 8 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願
【整理番号】 JP424
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 A61L 15/44
A61L 15/64

【発明者】

【住所又は居所】 熊本県熊本市大窪一丁目 6 番 1 号 財団法人化学及血清療法研究所内

【氏名】 内田 隆徳

【発明者】

【住所又は居所】 熊本県菊池郡旭志村川辺四の西沖 1 3 1 4 - 1 財団法人化学及血清療法研究所 菊池研究所内

【氏名】 新屋 希子

【発明者】

【住所又は居所】 熊本県熊本市大窪一丁目 6 番 1 号 財団法人化学及血清療法研究所内

【氏名】 嘉悦 洋

【発明者】

【住所又は居所】 熊本県菊池郡旭志村川辺四の西沖 1 3 1 4 - 1 財団法人化学及血清療法研究所 菊池研究所内

【氏名】 今村 隆幸

【発明者】

【住所又は居所】 熊本県菊池郡旭志村川辺四の西沖 1 3 1 4 - 1 財団法人化学及血清療法研究所 菊池研究所内

【氏名】 野崎 周英

【特許出願人】

【識別番号】 000173555
 【住所又は居所】 熊本県熊本市大窪一丁目 6 番 1 号
 【氏名又は名称】 財団法人 化学及血清療法研究所
 【代表者】 内野 矜自

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 056568
 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1
 【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 トロンビン固定化生体吸収性合成不織布

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 有効成分としてトロンビンが固定化されることを特徴とする生体吸収性合成不織布。

【請求項 2】 当該生体吸収性合成不織布の材料が、ポリグリコール酸、ポリ乳酸、グリコール酸と乳酸との共重合体からなる群より選択される材料を含む請求項 1 記載の生体吸収性合成不織布。

【請求項 3】 当該生体吸収性合成不織布がポリグリコール酸を材料とする不織布である請求項 1 または 2 に記載の生体吸収性合成不織布。

【請求項 4】 トロンビンがヒト血液由来トロンビンまたは遺伝子組換え技術により生産される組換えヒトトロンビンである請求項 1 に記載の生体吸収性合成不織布。

【請求項 5】 請求項 1 から 4 に記載の生体吸収性合成不織布を用いる止血材。

【請求項 6】 生体吸収性合成不織布をトロンビンを含む溶液に浸漬する工程、及び該工程で得られた不織布を凍結乾燥する工程を含むトロンビン固定化生体吸収性合成不織布の製造方法。

【請求項 7】 当該生体吸収性合成不織布の材料が、ポリグリコール酸、ポリ乳酸、グリコール酸と乳酸との共重合体からなる群より選択される材料を含む請求項 6 記載の製造方法。

【請求項 8】 当該生体吸収性合成不織布がポリグリコール酸を材料とする不織布である請求項 6 または 7 に記載の製造方法。

【請求項 9】 トロンビンがヒト血液由来トロンビンまたは遺伝子組換え技術により生産される組換えヒトトロンビンである請求項 6 に記載の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は有効成分としてトロンビンが固定化されたことを特徴とする生体吸収

性合成不織布、当該不織布からなる止血材及びその製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】

医療分野において止血管理は極めて重要な分野である。生体の血管が損傷を受けた場合、その局所では種々の凝固因子が活性化され最終的にフィブリンが形成されて止血に至る。その際、重要な酵素としてトロンビンが存在し、トロンビンがフィブリノーゲンに作用しフィブリンへ変換される。フィブリノーゲンは血液中に存在するが、そのままでは止血効果はなく、トロンビンの作用によって始めて止血効果を発揮する。つまり、トロンビンが生体の止血反応の重要な役割を果たしている。

【0003】

従来のトロンビン製剤は液状あるいは粉末であるが、出血局所で流されてしまいトロンビンの止血効果が十分発揮されていないことが多い。それを克服する目的で、生体吸収性材料にトロンビンを固定化したシートに関する種々の報告がある（例えば、特許文献1及び2）。ゼラチン製のシート素材に血液由来のトロンビンを固定化したものもその一例であるが、後述の実施例で示されるように十分な止血効果は認められず、かつ製造の困難性や実際の使用上の問題等から、実用化に至った例はほとんどない。また、牛ゼラチンに牛トロンビンを混合したゲルタイプの止血剤があるがBSEなどの危険性や圧迫性の面で問題が残る。

【0004】

また、トロンビンとその他の凝固因子を組み合わせたフィブリン接着剤もある。フィブリン接着剤は、トロンビンとフィブリノーゲンを主成分としており、フィブリノーゲンがトロンビンによりフィブリンに変換されることを利用した生体組織接着剤で、接着、止血、閉鎖を目的とし広く臨床の場で使用されている。しかしながら、術場においてトロンビン液、フィブリノーゲン液などをそれぞれ溶解して調製する手間がかかるため、緊急時には非常に不便である。そのような不便性を考慮して、出血部位に直接的にシートで圧迫するタイプのフィブリン接着剤も実用化されている。しかしながら、現行のシートタイプの接着剤の構成成分は、基材が馬コラーゲンであり、かつトロンビンは牛由来であり、ヒト以外の動

物成分が使用されているため、異種タンパクに対する抗体の出現やプリオン病等の人畜共通感染症の危険性が存在するため理想的なものとは言い難い。つまり、現状の局所止血剤は使用性や安全性の面で十分とは言えない。

【0005】

これらの問題を解決するには、ヒトと同じ成分で感染因子の存在しない凝固因子から成り、さらに止血効果を十分には発揮するために厳選工夫された素材によるシートタイプで、しかもその材質も生体に安全であることが求められる。

【0006】

【特許文献1】

国際公開第90/13320号パンフレット

【特許文献2】

特公昭61-59737号公報

【0007】

【課題を解決するための手段】

そこで、本発明者は上記の諸問題に鑑み、鋭意検討した結果、局所止血剤に関する本発明を完成した。すなわち、本発明は、生体吸収性材料の中でも特に不織布に加工された生体吸収性合成不織布に、止血の有効成分であるトロンビンが固定化された生体吸収性合成不織布、及び当該不織布からなる止血材に関する。以下、発明の詳細を説明する。

【0008】

【発明の実施の形態】

本発明に使用される生体吸収性合成不織布は、生体吸収性の合成繊維からなる不織布であれば、特に限定されるものではない。また、本不織布は、いかなる患部にも確実に被覆可能なように適度な柔軟さを有することが好ましい。例えば、そのような不織布を形成しうる合成繊維として、ポリグリコール酸、ポリ乳酸、またはグリコール酸及び乳酸の共重合体などを不織布に加工したものが使用可能である。中でも、ポリグリコール酸を不織布に加工した生体吸収性合成不織布は、本目的に極めて好ましい素材である。

【0009】

当該不織布の形状としては特に限定されるものではないが、種々の用途への適用しやすさの観点からシート状であることは好ましい形状の一つである。

【0010】

トロンビンとしては、ヒト血液由来のトロンビン、または遺伝子組換え技術により得られる組換えヒトトロンビンのいずれも使用可能である。また、当該トロンビンに加え、薬学的に許容しうる安定剤及び添加剤を添加してもよい。そのような安定剤及び添加剤の例として、例えば、アルブミン、ポリエチレングリコール、アルギニン、ヒアルロン酸ナトリウム、グリセリン、マンニトール及び塩化カルシウムなどがある。

【0011】

本発明のトロンビン被覆生体吸収性合成不織布は、例えば下記のようにして製造することができる。

トロンビンを生理食塩水または緩衝液に溶かし、さらに選択的にそのトロンビン溶液に安定化剤や添加剤として、アルブミン、ポリエチレングリコール、アルギニン、ヒアルロン酸、グリセリン、マンニトールや塩化カルシウム等を適宜加える。当該溶液に生体吸収性合成不織布を浸漬し、 -80°C 、2時間凍結後、乾燥することにより得られる。

【0012】

出血局所を本発明のトロンビン固定化生体吸収性不織布で圧迫すると、圧迫効果により血液の流出を防ぎ、さらにシート中のトロンビンが血液中のフィブリノーゲンと即座に反応しフィブリンに変換することにより、局所での止血効果が発揮される。また、形成されたフィブリンは周辺組織と接着する。

【0013】

ポリグリコール酸を材料とする生体吸収性不織布は既に医療用として使用されており、生体に吸収され水と二酸化炭素に分解されることから、安全性も実証されている。

【0014】

このように本トロンビンシートは、局所出血に簡便かつ早急に対処が可能であり、圧迫止血と血液凝固反応により効果的な止血を可能とする。しかも、いずれ

の成分も生体に安全なものを用いているため医療現場で安心して利用できる。

【0015】

以下、本発明の実施例を示し本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

【0016】

【実施例】

《実施例1：組換えトロンビンの調製》

組換えトロンビンは特願2001-206919に準じて調製された。簡潔に記載すると、ヒトプレトロンビン遺伝子を導入された動物細胞を培養して、その培養液からプレトロンビンを精製する。一方、エカリン遺伝子を導入された動物細胞の培養液からエカリンを精製して、そのエカリンにより、プレトロンビンを活性化して、トロンビンを精製することができる。

【0017】

《実施例2：トロンビン固定化シートの作製》

本発明のトロンビン固定化シートの作製は以下の方法に従って行った。

0.001～0.01%ヒアルロン酸ナトリウム（ナカライ化学：18237-41）または0.5～2%グリセリン（ナカライ化学：170-18）を含む溶液に、マンニトール（ナカライ化学：213-03）を最終濃度0.5～1.5%、塩化カルシウムを40mM加え、組換えトロンビンを最終濃度1000U/mLの濃度で添加する。この溶液をポリグリコール酸からなる生体吸収性合成不織布 3 cm×3 cm（製品名：ネオベール／ゲンゼ(株)，厚さ：0.15mm）に 1 cm²あたり0.05mLを滴下する。このシートを－80℃で2時間凍結後、乾燥させたものをトロンビン固定化シートのサンプルとする。

【0018】

対照のシートとして、組換えトロンビン処理なしの生体吸収性合成不織布、特許文献1の実施例の記載に従って作製したゼラチン製止血スポンジ、また、市販のシート状フィブリン接着剤を使用した。

<第1群：トロンビン固定化シート>

ポリグリコール酸製不織布に組換えトロンビン50U/cm²を固定化したシートを用いた。

<第2群：トロンビン非固定化シート>

ポリグリコール酸製不織布を組換えトロンビンを含まない条件で第1群と同様に固定化したシートを用いた。

<第3群：トロンビン固定化止血スポンジ>

特許文献1の実施例に記載された方法に従って調製したトロンビンを含むゼラチン製止血スポンジ（製品名：スポンゴスタン/ジョンソン&ジョンソン社）を用いた。

<第4群：シート状フィブリン接着剤>

コラーゲンシートにフィブリン糊が固定化されたシート状フィブリン接着剤（製品名：タココンプ/鳥居薬品(株)）：フィブリノーゲン及びトロンビン等の成分をスポンジ状のウマコラーゲンのシートを支持体とし、シートの片面に真空乾燥により固着されたもの）を用いた。

【0019】

《実施例3：滲出性出血に対する止血試験》

動物の止血モデルとしてはウサギを用いた。ウサギを開腹し、肝臓の一部を切除して、その出血部位に、実施例2で作製した各群の止血材を創面全体にあて、1分間圧迫した。具体的な評価方法を以下に示す。

- ①ネンブタール麻酔下でウサギを開腹。
- ②ヘパリンを300U/kg静脈内投与。
- ③肝臓の右葉、内側左葉または外側左葉表面を、直径1.5cmの円形に4mmの厚さに切除。
- ④切除創からの出血を10秒間ガーゼに吸収して重量を測定。切除創作成後の出血量は、約0.50gであった。
- ⑤上述の各種方法で止血を試みた。それぞれの処置は駆血をせず血液が流出した状態で行った。
- ⑥それぞれの止血処置時間を含め5分間の出血をガーゼに吸収して重量を測定した。5分間経った時点で創面からの出血がみられた場合には、それぞれの止血処置と出血量の測定を繰り返し行った。
- ⑦止血処置は最大4回まで実施し、止血までに要した止血処置の回数と、止血処

置開始から止血までの出血の総重量で評価した（表1）。

【0020】

【表1】

群	各止血処置回数で止血できた数				止血処置後の総出血量 / g
	1回目	2回目	3回目	4回目	
第1群	7	1	0	0	0.51 ± 0.31
第2群	2	3	3	0	2.03 ± 0.95
第3群	0	2	4	2*	6.28 ± 1.67
第4群	0	4	1	3*	6.70 ± 2.64

*：4回目の止血処置後も止血不可能例があった。

【0021】

表1に示されるように、本発明のトロンビン固定化シートは、対照のシートと比較して、優れた止血効果が認められた。トロンビン処理をしていない不織布（第2群）だけでは殆ど止血効果は認められなかったが、特許文献1に記載されたトロンビン固定化ゼラチン製止血スポンジ（第3群）よりも止血効果は優れていた。この結果は公知の生体吸収性材料の中でも特に本発明において基材として使用された生体吸収性不織布が止血目的に好適な材料であることを示すものである。さらにこの不織布にトロンビンが固定化された止血材により迅速かつ確実な止血が可能となることが明らかになった。さらに、コラーゲンを基材とするシート状フィブリン接着剤（第4群）も、本比較試験の結果、本発明のトロンビン固定化シートと比べて、はるかに止血効果は劣った。

【0022】

【発明の効果】

本発明によるトロンビン固定化生体吸収性合成不織布は、

- ・止血効果が優れている
- ・緊急時の取り扱いが容易
- ・安全性に優れている
- ・経時的に吸収される、

- ・伸縮性・柔軟性に優れている、
- ・広範囲に亘る止血も可能となる、
- ・炎症反応が軽微であるかまたは全く惹起しない

のような性質を有しており、理想的な局所止血材である。

本発明により、外科手術のさまざまな分野で組織の閉鎖を必要とする手術において、安全に止血を行うことのできる生体吸収性合成不織布からなる止血材を提供することが可能となった。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 安全かつ効果的な止血材を提供する。

【解決手段】 有効成分としてトロンビンを固定化することを特徴とする生体吸収性合成不織布、及び当該生体吸収性合成不織布からなる止血材に関する。当該トロンビン固定化生体吸収性不織布は、生体吸収性合成不織布をトロンビンを含む溶液に浸漬する工程、及び該工程で得られた不織布を凍結乾燥する工程を含む工程により製造することができる。本発明のトロンビン固定化生体吸収性合成不織布を用いると、迅速かつ確実な止血が可能となる。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2002-330677
受付番号	50201722044
書類名	特許願
担当官	第四担当上席 0093
作成日	平成14年11月15日

<認定情報：付加情報>

【提出日】	平成14年11月14日
-------	-------------

次頁無

特願2002-330677

出願人履歴情報

識別番号

[000173555]

1. 変更年月日

1996年 3月 4日

[変更理由]

住所変更

住 所

熊本県熊本市大窪一丁目6番1号

氏 名

財団法人化学及血清療法研究所